

*А.Г. Иевлева^{1,2}, Т.В. Городнова¹, С.Н. Алексахина¹, Е.И. Анисимова³,
Л.П. Гиголаева¹, А.П. Соколенко^{1,2}, К.А. Загороднев², В.Н. Дмитриев^{4,5}, И.В. Берлев¹,
П.В. Криворотько¹, Е.Н. Имянитов^{1,2,6}*

Детекция мутаций TP53 в плазме крови больных раком яичника и раком молочной железы

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

³СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург,

⁴Медицинский институт НИУ «БелГУ», г. Белгород,

⁵ОГБУЗ «Белгородский онкологический диспансер», г. Белгород,

⁶ФГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Актуальность. Анализ циркулирующей опухолевой ДНК предоставляет широкие возможности для контроля результатов лечения онкологических заболеваний. Соматические мутации в гене TP53 присутствуют практически во всех карциномах молочной железы, развившихся у носительниц наследственных мутаций в гене BRCA1, а также в подавляющем большинстве серозных опухолей яичника высокой степени злокачественности, что позволяет использовать их для мониторинга заболевания у пациенток с перечисленными патологиями.

Целью работы стал анализ содержания опухоль-специфических мутаций TP53 в плазме крови пациенток с серозным низкодифференцированным раком яичника (РЯ) и BRCA1-ассоциированным раком молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Как минимум по одному образцу плазмы было получено от 10 больных РЯ и 7 пациенток с BRCA1-ассоциированным РМЖ. Первичный внутриопухольный статус гена TP53 определялся в архивном опухолевом материале путем таргетного секвенирования нового поколения. Тестирование образцов плазмы на наличие опухоль-специфических мутаций TP53, и в одном случае — мутации BRAF V600E, осуществлялось при помощи цифровой капельной ПЦР.

Результаты. При раке яичника во всех 8 образцах циркулирующей ДНК, полученных в момент прогрессирования заболевания, до начала или во время неoadьювантного лечения были обнаружены мутации TP53. Напротив, 8 образцов плазмы, полученных в период ремиссии, после оперативного лечения или после неoadьювантной химиотерапии не содержали опухоль-специфических мутаций.

При раке молочной железы циркулирующая опухолевая ДНК была выявлена в 2 из 4 образцов, полученных перед лечением, и не детектировалась после окончания терапии или в фазу ремиссии.

Заключение. При раке яичника наблюдается хорошее соответствие между присутствием опухолевой ДНК в циркуляции и клинической картиной заболевания. Соответственно, тестирование циркулирующей ДНК с мутацией TP53 может использоваться в качестве биомаркера при этом заболевании. При раке молочной железы II-III стадий, в отличие от РЯ, опухолевая ДНК в плазме присутствует в меньших количествах, что затрудняет поиск мутаций TP53 в материале «жидкой биопсии».

Ключевые слова: жидкая биопсия; рак молочной железы; рак яичника; мутация

Введение

Жидкая или жидкостная биопсия в онкологии (liquid biopsy) представляет собой исследование опухоль-ассоциированных фрагментов и молекул в биологических жидкостях организма, чаще всего в плазме крови. Возрастающий интерес к жидкой биопсии связан как с её неинвазивным характером и универсальностью, так и с появлением основанных на цифровой капельной ПЦР и секвенировании нового поколения высокочувствительных методик, позволяющих обнаружить минимальные количества опухоль-специфических нуклеиновых кислот в циркуляции. Предполагается, что жидкая биопсия может стать удобным инструментом для мониторинга злокачественных новообразований, а именно контроля эффективности терапии, раннего выявления резистентности к лечению, оценки риска рецидива и др. [1].

Известно, что частота повреждений гена TP53 составляет более 90% в BRCA1-опосредованных наследственных и в ненаследственных ER/PR/HER2-негативных карциномах молочной железы, а также в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности [2, 3]. Это делает возможным использование мутаций TP53 для мониторинга заболевания у пациенток с перечисленными патологиями. До недавнего времени фактором, затрудняющим применение мутаций TP53 в качестве биомаркера на практике, являлось большое разнообразие вариантов соматических повреждений в гене. В последние годы получил распространение подход, предполагающий разработку индивидуальных тестов для каждого из включённых в исследование пациентов. Чаще всего для этих целей используется цифровая капельная ПЦР, сочетающая высокую чувствительность и специфичность [4]. Корреляции между клиническими параметрами и содержанием мутаций TP53 в плазме крови при раке яичника (РЯ) уже удалось продемонстрировать в некоторых исследованиях [5-9]. Так, было показано, что количество циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) коррелирует с объемом опухолевой массы [6], и что значительное снижение или исчезновение фракции мутаций TP53 после химиотерапии ассоциировано с лучшими показателями безрецидивной выживаемости [5-7].

Возможность использования цоДНК для определения прогноза и мониторинга также активно изучается при раке молочной железы (РМЖ) [10]. Подавляющее число подобных исследований было выполнено с привлечением метастатического РМЖ [11-16], поскольку для ранних стадий карцином молочной железы характерно крайне низкое содержание цоДНК. В этих работах были выявлены определённые закономерности между присутствием/концентрацией в плазме ДНК с мутациями и стадией опухолевого процесса, временем до прогрессирования и выживаемостью.

В задачи нашего исследования вошел анализ содержания опухоль-специфических мутаций TP53 в плазме крови пациенток с серозным низкодифференцированным РЯ и BRCA1-ассоциированным РМЖ.

Материалы и методы

В исследование были включены 24 пациентки с доступным для анализа опухолевым материалом, от которых был получен хотя бы один образец плазмы крови. В их число вошли 15 случаев серозного низкодифференцированного РЯ (13 от женщин-носительниц наследственных мутаций BRCA1, 1 от пациентки-носительницы наследственной мутации в гене CHEK2 (CHEK2 IVS2+1G>A), 1 случай низкодифференцированной серозной карциномы от пациентки без наследственных мутаций) и 9 BRCA1-опосредованных РМЖ. Первичный внутриопухолевый ста-

тус гена TP53 определялся в архивном операционном или биопсийном материале путем секвенирования нового поколения с применением таргетной панели TruSight® Tumor 15 (Illumina), включающей 15 локусов. Пробоподготовка и секвенирование осуществлялись по протоколам производителя на оборудовании MiSeq, Illumina. Для 16 обнаруженных мутаций TP53 и выявленной мутации BRAF V600E были разработаны основанные на цифровой капельной ПЦР тесты (табл. 1), предназначенные для тестирования образцов плазмы. Процедура отработки тестов включала оценку характерного для каждой реакции уровня ложнопозитивных результатов. Количество ложнопозитивных сигналов оценивалось посредством анализа образцов ДНК из лейкоцитов здоровых доноров, предположительно негативных в отношении мутаций TP53. Образцы ДНК здоровых доноров разводились до концентрации, сопоставимой с концентрацией ДНК из плазмы.

Образцы крови, полученные от пациенток, помещались в пробирки cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes (Norgen). Плазма была отделена путем 2-кратного центрифугирования (10 мин, 400 g при комнатной температуре и 10 мин, 14400 g при 4°C). Внеклеточная ДНК выделялась посредством набора QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Цифровая капельная ПЦР (digital droplet PCR, ddPCR) осуществлялась на оборудовании QX100 Bio-Rad в соответствии с рекомендациями производителя. Каждая реакция включала 2X ddPCR смесь Supermix for Probes (без UTP, Bio-Rad), 1.0 µM каждого праймера и 0.5 µM каждой метки, и 2 µl ДНК в объеме 22 мкл. Каждый образец ДНК из плазмы амплифицировался в не менее чем 3 повторях, а при обработке результатов данные суммировались. Анализ результатов выполнялся с помощью программы QuantaSoft Software version 1.7.4.

Абсолютное количество мутантных копий ДНК в 1 мл плазмы крови (M) рассчитывалось по формуле:

$$M = \frac{C_{mut} \left(\frac{copies}{\mu l} \right) \times V_{react} (\mu l) \times N_{react} \times V_{plDNA} (\mu l)}{VDNA_{input} (\mu l) \times V_{pl} (ml)},$$

где

C_{mut} — количество мутантных копий ДНК в 1 мкл реакционной смеси

V_{react} — объем реакционной смеси (22 мкл)

N_{react} — количество объединённых ячеек, в которых амплифицировался образец

V_{plDNA} — объем раствора ДНК, выделенной из плазмы

$V_{DNAinput}$ — объем раствора ДНК в реакции

V_{pl} — объем плазмы, из которого была выделена ДНК

Для сравнения количественных показателей использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты

Тестирование внутриопухолевого статуса TP53 было выполнено в 24 случаях. Мутации TP53 были обнаружены в 9 из 15 РЯ (60%) и 7 из 9 РМЖ (78%). Получившаяся относительно низкая частота мутаций, вероятнее всего, обусловлена техническими причинами: сложностью секвенирования деградированной архивной ДНК и/или неполным покрытием гена TP53 в используемой панели. В опухоли яичника от пациентки с CHEK2-мутацией нарушений TP53 не было обнаружено, однако была выявлена замена BRAF p.V600E, также потенциально пригодная для мониторинга циркулирующей опухолевой ДНК.

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, использованные для детекции мутаций в плазме посредством цифровой капельной ПЦР

Мутация	Праймеры/ Зонды	Последовательность	Размер фрагмента, п.о.	Температура отжига, °С
TP53 c.723delC (p.C242Afs*5)	Праймер F	TCTGACTGTACCACCATCC	76	59
	Праймер R	GGATGGGCCTCCGGTTCA		
	Зонд WT	CCGCCCATGCAGGAACTGTT		
	Зонд MUT	CCGCCCATGCAGAACTGTTA		
TP53 c.526_528delTGC (p.C176delC)	Праймер F	TACAAGCAGTCACAGCACAT	75	53
	Праймер R	ACCATCGCTATCTGAGCAG		
	Зонд WT	AGGCGCTGCCCCACCAT		
	Зонд MUT	TGAGGCGCCCCACCATGA		
BRAF c.1799T>A (p.V600E)	Праймер F	GAAGACCTCACAGTAAAAATAG	122	56
	Праймер R	ATAGCCTCAATTCTTACCATCC		
	Зонд WT	TCTAGCTACAGTAAAATCTCGATGG		
	Зонд MUT	TCTAGCTACAGAGAAAATCTCGATGG		
TP53 c.997delC (p.R333fs)	Праймер F	TCTCCCCCTCCTCTGTTG	94	55
	Праймер R	CCTGGGCATCCTTGAGTT		
	Зонд WT	CGCTCACGCCACGGATCTGC		
	Зонд MUT	CGCTCACGCCACGATCTGC-		
TP53 c.1010G>T (p.R337L)	Праймер F	TCTCCCCCTCCTCTGTTG	94	60
	Праймер R	CCTGGGCATCCTTGAGTT		
	Зонд WT	ATCTCGAAGCGCTCACGCC		
	Зонд MUT	ATCTCGAAGAGCTCACGCC		
TP53 c. 722C>T (p.S241F)	Праймер F	TCTGACTGTACCACCATCC	76	60
	Праймер R	GGATGGGCCTCCGGTTCA		
	Зонд WT	CCGCCCATGCAGGAACTGTT		
	Зонд MUT	CCGCCCATGCAGAACTGTT		
TP53 c.637C>T (p.R213*)	Праймер F	GGAAATTTGCGTGTGGAGTAT	76	55
	Праймер R	CAGGCGGCTCATAGGGCA		
	Зонд WT	CACTATGTCGAAAAGTGTCTCTG		
	Зонд MUT	CACTATGTCGAAAAGTGTCTCTG		
TP53 c.526T>C (p.C176R)	Праймер F	TACAAGCAGTCACAGCACAT	75	62
	Праймер R	ACCATCGCTATCTGAGCAG		
	Зонд WT	AGGCGCTGCCCCACCAT		
	Зонд MUT	AGGCGCGCCCCACCAT		
TP53 c.97-1G>A	Праймер F	TCCTCTGACTGCTCTTTTC	72	52
	Праймер R	GACAGCATCAAATCATCCAT		
	Зонд WT	ACCCATCTACAGTCCCCCT		
	Зонд MUT	ACCCATCTACAATCCCCCT		
TP53 c.764T>G (p.I255S)	Праймер F	ACATGTGTAACAGTTCCTGTC	92	56
	Праймер R	CAAGTGGCTCCTGACCTG		
	Зонд WT	TCCTCACCATCATCACA CTG		
	Зонд MUT	ATCCTCACCATCAGCACACT		
TP53 c.775G>T (p.D259Y)	Праймер F	TGTGTAACAGTTCCTGCATG	91	56
	Праймер R	TGGCAAGTGGCTCCTGAC		
	Зонд WT	TGGAGTCTCCAGTGTGATGAT		
	Зонд MUT	TGGAGTATCCAGTGTGATGAT		

Мутация	Праймеры/ Зонды	Последовательность	Размер фрагмента, п.о.	Температура отжига, °С
TP53 с. 832C>A (p.P278T)	Праймер F	TAATCTACTGGGACGGAACA	72	55
	Праймер R	TCCTCTGTGCGCCGGTCT		
	Зонд WT	CTCCCAGGACAGGCACAAACAC		
	Зонд MUT	CTCCCAGTACAGGCACAAACAC		
TP53 с.724T>C (p.C242R)	Праймер F	CTAGGTTGGCTCTGACTGTA	132	60
	Праймер R	TGGCAAGTGGCTCCTGAC		
	Зонд WT	CGCCCATGCAGGAACTGTTA		
	Зонд MUT	CGCCCATGCGGAACTGTTA		
TP53 с.817C>T (p.R273C)	Праймер F	TAATCTACTGGGACGGAACA	72	53
	Праймер R	TCCTCTGTGCGCCGGTCT		
	Зонд WT	CACAAACACGCACCTCAAAGC		
	Зонд MUT	CACAAACACACACCTCAAAGC		
TP53 с.998_998delG (p.R333Lfs)	Праймер F	TCTCCCCCTCCTCTGTTG	94	59
	Праймер R	CCTGGGCATCCTTGAGTT		
	Зонд WT	CGCTCACGCCACGGATCTGC		
	Зонд MUT	CGCTCACGCCAGGATCTGC		
TP53 с.868delC (p.R290Afs*55)	Праймер F	TGCCTGTCTGGGAGAGA	95	56
	Праймер R	CTCGCTTAGTGCTCCCTG		
	Зонд WT	CCTTTCTTGCAGGATCTCTT		
	Зонд MUT	CCTTTCTTGCAGATCTCTT		
TP53 с.559+1G>A	Праймер F	CCCCACCATGAGCGCT	70	53
	Праймер R	CAACCAGCCCTGTCGTCT		
	Зонд WT	CTGCTCACCATCGCTATCTG		
	Зонд MUT	CTGCTCATCATCGCTATCTG		

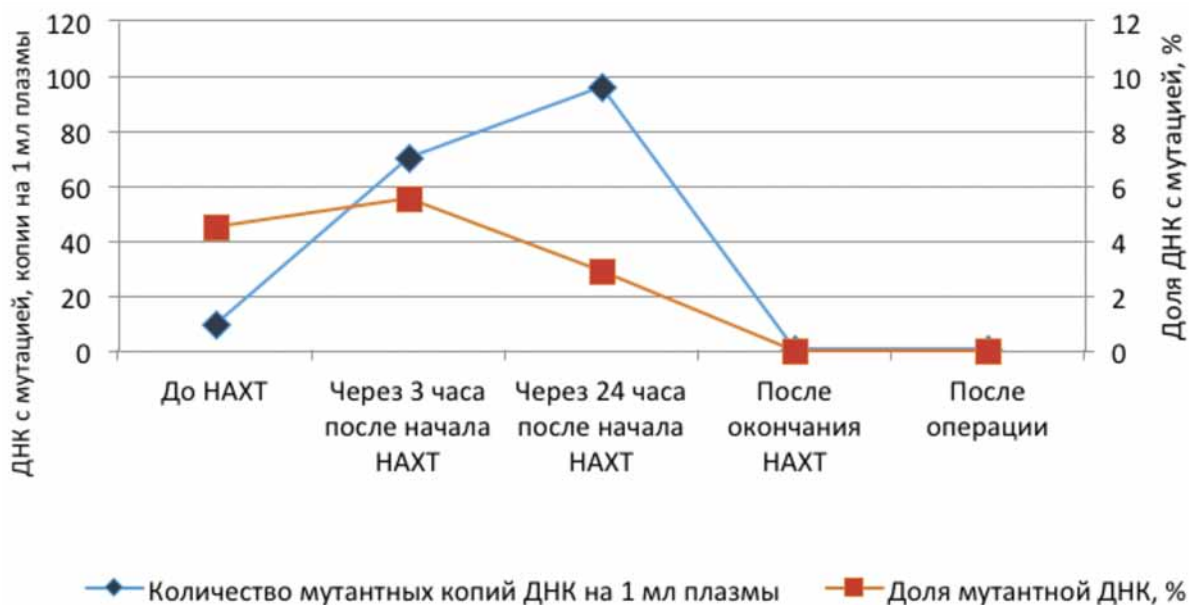


Рис. 1. Динамика содержания мутации TP53 в плазме крови пациентки с раком яичника до начала, в процессе и после окончания неoadьювантной химиотерапии (НАХТ)

Таблица 2. Характеристика включённых в исследование случаев и результаты тестирования образцов плазмы посредством цифровой капельной ПЦР (РЯ - рака яичника, РМЖ - рак молочной железы, НАХТ - неадывантная химиотерапия)

№	Диагноз, стадия	Возраст	Наследственная мутация	Соматическая мутация в опухоли	Плазма	Статус	Мутация в плазме обнаружена	Число капель (wt/mut)	Количество мутантных копий ДНК на 1 мл плазмы	Фракция ДНК с мутацией, %
1	РЯ, IV	51	BRCA1 5382insC	TP53 с.723delC	1	Прогрессирование	да	620/4	12.27	0.64
2	РЯ, IIIC	59	BRCA1 4153delA	TP53 с.526_528delTGC	1	Ремиссия	нет	426/1	6.71	0.23
3	РЯ, IIIC	30	CHEK2 IVS2+1G>A	BRAF с.1799T>A	1	Ремиссия	нет	96/0	0.00	0.00
4	РЯ, IV	42	BRCA1 5382insC	TP53 с.997delC	1	Прогрессирование	да	45/8	116.05	15.10
					2	Прогрессирование (через 5 мес., на фоне терапии)*	да	161/12	67.65	6.93
5	РЯ, IC	56	BRCA1 185delAG	TP53 с.1010G>T	1	Прогрессирование	да	560/6	17.00	1.06
6	РЯ, IIIC	63	BRCA1 5382insC	TP53 с. 722C>T	1	Ремиссия	нет	958/0	0.00	0.00
					2	Ремиссия (через 6 мес.)*	нет	453/0	0.00	0.00
7	РЯ, IV	57	BRCA1 5382insC	TP53 с.637C>T	1	После оптимальной циторедуктивной операции	нет	920/1	2.02	0.10
8	Рак маточной трубы, II	62	нет	TP53 с.526T>C	1	Ремиссия	нет	417/0	0.00	0.00
9	РЯ, IIIC	51	BRCA1 5382insC	TP53 с.97-1G>A	1	до НАХТ	да	68/13	98.45	16.00
10	РЯ, IIIC	46	BRCA1 4153delA	TP53 с.764T>G	1	До НАХТ	да	50/2	9.90	4.52
					2	Во время НАХТ (через 3 часа)	да	370/20	70.40	5.53
					3	Во время НАХТ (через 24 часа)	да	917/26	96.25	2.92
					4	После НАХТ	нет	233/0	0.00	0.00
					5	После операции	нет	143/0	0.00	0.00
11	РМЖ, IIIA	48	BRCA1 5382insC	TP53 с.775G>T	1	Перед операцией	нет	76/2	11.52	1.35
					2	После операции	нет	149/0	0.00	0.00
					3	Ремиссия (через 8 мес.)*	нет	465/1	27.23	0.52
12	РМЖ, IIA	38	BRCA1 5382insC	TP53 с. 832C>A	1	Ремиссия	нет	92/0	0.00	0.00
13	РМЖ	34	BRCA1 5382insC	TP53 с.724T>C	1	После адывантной ХТ	нет	77/1	4.73	1.21
					2	Ремиссия (через 9 мес.)*	нет	112/0	0.00	0.00
					3	Ремиссия (через 7 мес.)*	нет	222/0	0.00	0.00
					4	Ремиссия (через 7 мес.)*	нет	48/0	0.00	0.00
14	РМЖ, IIB	39	BRCA1 4153delA	TP53 с.817C>T	1	Перед лечением	да	162/3	5.80	1.20
15	РМЖ, IIA	44	BRCA1 4153delA	TP53 с.998_998delG	1	Ремиссия	нет	151/0	0.00	0.00
					2	Ремиссия (через 9 мес.)*	нет	9/0	0.00	0.00
16	РМЖ, IIA	57	BRCA1 4153delA	TP53 с.868delC	1	Перед операцией	нет	312/0	0.00	0.00
					2	После операции	нет	194/0	0.00	0.00
17	РМЖ, IIB	38	BRCA1 4153delA	TP53 с.559+1G>A	1	Перед лечением	да	360/2	4.95	0.55
					2	После адывантной терапии	нет	247/0	0.00	0.00

Примечание: *указан временной интервал после предыдущего забора плазмы

Всего в анализ плазмы крови был включен 31 образец от 17 пациенток: 16 образцов от 10 больных РЯ и 15 образцов от 7 больных РМЖ. В 9 случаях имелось только по одному образцу плазмы от пациентки, в 5 случаях исследовались парные образцы, и в трёх случаях имелись серии из 3, 4 и 5 образцов плазмы соответственно (табл. 2).

Для всех 17 идентифицированных мутаций были разработаны основанные на принципе аллельной дискриминации и технологии цифровой капельной ПЦР индивидуальные тесты. Среднее количество амплифицируемых копий ДНК на образец составило $332,2 \pm 53,3$, а среднее содержание внеклеточной ДНК в пересчете на 1 мл плазмы — $1382,3 \pm 188,3$ копии. С целью определения порогового количества позитивных по мутации капель, для каждого ddPCR-теста был определен показатель предела обнаружения (limit of blank, LOB) [4, 17]. На основе рассчитанных показателей в качестве порогового значения было выбрано 2 или в некоторых случаях 3 «мутантных» капли на реакцию.

При раке яичника во всех образцах циркулирующей ДНК, полученных в момент прогрессирования заболевания, до начала или во время неoadьювантного лечения, были обнаружены мутации TP53 (в 8 образцах от 4 пациенток). Среднее количество копий ДНК с мутацией на 1 мл плазмы в этих случаях составило $61,0 \pm 15,1$ (диапазон: 9,9-116,1), а среднее содержание мутантного аллеля — $6,6 \pm 2,1\%$ (диапазон: 0,64-16,0%). Напротив, образцы плазмы, полученные в период ремиссии (1-2 года после завершения лечения, 5 образцов от 4 пациенток), после оперативного лечения (2 образца от 2 пациенток) или после неoadьювантной химиотерапии ($n = 1$), не содержали опухоль-специфических мутаций.

Коллекция плазмы от больных раком молочной железы II-III стадий была представлена образцами до начала лечения ($n = 4$), после операции ($n = 2$), после адьювантной химиотерапии ($n = 2$) и в период клинической ремиссии ($n = 7$). Мутации TP53 были обнаружены только в 2 образцах, полученных перед лечением (содержание мутантной ДНК составило 4,95 и 5,8 копий на мл плазмы, или 1,2% и 0,55% от всей внеклеточной ДНК) (табл. 2).

Общая концентрация присутствующей в плазме крови свободной ДНК не отличалась между образцами содержащими ($n = 10$) и не содержащими опухоль-специфические мутации ($n = 21$) ($p = 0.542$).

В одном из анализируемых случаев РЯ была получена серия из 5 образцов плазмы крови: до начала лечения, через 3 и 24 часа после пер-

вого введения химиопрепаратов в ходе НАХТ, после завершения НАХТ и после операции по удалению опухоли. На рис. 1 продемонстрировано, что в первые сутки терапии происходит значительное нарастание абсолютного количества циркулирующей ДНК, при этом доля мутантной ДНК оказывается максимальной в первые часы терапии, а затем снижается. После химиотерапии и операции мутация TP53 не обнаруживается.

Обсуждение

В работе было осуществлено тестирование цоДНК у пациенток с наследственным раком молочной железы и раком яичника на разных этапах терапии. Результаты продемонстрировали принципиальную возможность детекции индивидуальных мутаций TP53 при помощи цифровой капельной ПЦР в плазме, и хорошее соответствие между присутствием опухолевой ДНК в циркуляции и клинической картиной заболевания у больных РЯ. Во всех 8 образцах, полученных до или в течение первых суток с момента начала неoadьювантной химиотерапии, а также в фазу прогрессирования, была детектирована цоДНК. В исследованной коллекции плазмы от пациенток с РМЖ опухоль-специфические мутации были обнаружены в половине (2/4) образцов до лечения, и не выявлялись после окончания терапии или в период ремиссии. Известно, что при локализованных формах опухолей молочной железы наблюдается крайне низкое содержание свободной циркулирующей ДНК (в среднем около 5 нг в 1 мл плазмы, что соответствует примерно 1500 копиям гаплоидного генома), а на фракцию опухолевой ДНК при этом приходится менее 1% от общего количества этой молекулы (0.1-0.7%) [18-22]. В нашей работе наблюдалась тенденция к более низкому общему содержанию свободной ДНК на 1 мл плазмы при РМЖ в сравнении с РЯ (медиана этого показателя составила 888 и 1531 копий/мл соответственно, $p=0.085$). К ограничениям настоящего исследования можно отнести невысокую фактическую чувствительность тестирования мутаций в плазме, обусловленную как низкой концентрацией циркулирующей ДНК, так и небольшим количеством проанализированных в каждом случае молекул ДНК (эквивалентным ≈ 0.5 мл плазмы). Исходя из количества амплифицированных копий ДНК, средняя чувствительность для 31 реакции составила 0,9% (диапазон: 0,09-10%). Можно предположить, что исследование больших объемов плазмы (4-8 мл, что соответствует 10-20 мл крови) позволит обеспечить более эффективное выявление опухоль-специфических мутаций.

Необходимо отметить, что если пригодность оценки цоДНК для мониторинга заболевания у пациентов с метастатическими формами опухолей уже была неоднократно показана [11, 16, 23, 24], то ценность «жидкой биопсии» при локализованных формах рака менее очевидна. Например, в нескольких недавних исследованиях частота выявления цоДНК при раннем РМЖ до начала терапии варьировала в пределах 40-100%, и оказалась выше при индивидуализированном анализе опухоль-специфических панелей мутаций с использованием NGS [18-22].

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что при РЯ до начала лечения и в момент прогрессирования циркулирующая опухолевая ДНК присутствует в значительных количествах (в среднем, около 60 копий на 1 мл плазмы; более 0,5% от всей свободной ДНК), и может быть обнаружена при анализе всего 0,5-1 мл плазмы крови. При РМЖ наблюдается более низкое содержание опухоль-специфических мутаций в плазме, и аналогичные параметры тестирования позволяют выявить цоДНК лишь в половине случаев перед лечением.

Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что тестирование циркулирующей ДНК с мутацией TP53 может использоваться в качестве биомаркера при раке яичника. При раке молочной железы II-III стадий, в отличие от РЯ, опухолевая ДНК в плазме присутствует в меньших количествах, что затрудняет поиск мутаций TP53 в материале «жидкой биопсии».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект RFMEFI60419X0216, соглашение № 075-15-2019-1721 от 25.11.2019).

ЛИТЕРАТУРА

- Barbosa A., Peixoto A., Pinto P. et al. Potential clinical applications of circulating cell-free DNA in ovarian cancer patients. *Expert Rev. Mol. Med.* 2018; 20:e6. doi: 10.1017/erm.2018.5.
- Manié E., Vincent-Salomon A., Lehmann-Che J. et al. High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res.* 2009;69(2): 663-671. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1560.
- Ahmed A.A., Etemadmoghadam D., Temple J. et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high

- grade serous carcinoma of the ovary. *J. Pathol.* 2010;221(1):49-56.
- Rowlands V., Rutkowski A.J., Meuser E. et al. Optimisation of robust singleplex and multiplex droplet digital PCR assays for high confidence mutation detection in circulating tumour DNA. *Sci. Rep.* 2019;9(1):12620. doi: 10.1038/s41598-019-49043-x.
- Pereira E., Camacho-Vanegas O., Anand S. et al. Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145754. doi: 10.1371/journal.pone.0145754.
- Parkinson C.A., Gale D., Piskorz A.M. et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med.* 2016;13(12):e1002198. doi: 10.1371/journal.pmed.1002198.
- Kim Y.M., Lee S.W., Lee Y.J. et al. Prospective study of the efficacy and utility of TP53 mutations in circulating tumor DNA as a non-invasive biomarker of treatment response monitoring in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *J. Gynecol. Oncol.* 2019;30(3):e32. doi: 10.3802/jgo.2019.30.e32.
- Vitale S.R., Groenendijk F.H., van Marion R. et al. TP53 Mutations in Serum Circulating Cell-Free Tumor DNA As Longitudinal Biomarker for High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Biomolecules.* 2020;10(3):415. doi: 10.3390/biom10030415.
- Noguchi T., Sakai K., Iwahashi N. et al. Changes in the gene mutation profiles of circulating tumor DNA detected using CAPP-Seq in neoadjuvant chemotherapy-treated advanced ovarian cancer. *Oncol. Lett.* 2020;19(4):2713-2720. doi: 10.3892/ol.2020.11356.
- Alimirzaie S., Bagherzadeh M., Akbari M.R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin. Genet.* 2019;95(6): 643-660. doi: 10.1111/cge.13514.
- Dawson S.J., Tsui D.W., Murtaza M. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(13):1199-1209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261.
- Madic J., Kiialainen A., Bidard F.C. et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer.* 2015;136(9):2158-2165. doi: 10.1002/ijc.29265.
- Liang D.H., Ensor J.E., Liu Z.B. et al. Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2016;155(1): 139-149. doi: 10.1007/s10549-015-3635-5.
- Nakauchi C., Kagara N., Shimazu K. et al. Detection of TP53/PIK3CA Mutations in Cell-Free Plasma DNA From Metastatic Breast Cancer Patients Using Next Generation Sequencing. *Clin. Breast Cancer.* 2016;16(5):418-423. doi: 10.1016/j.clbc.2016.05.004.
- Rossi G., Mu Z., Rademaker A.W. et al. Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells: Comprehensive Liquid Biopsy Analysis in Advanced Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018;24(3): 560-568. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2092.
- O'Leary B., Hrebien S., Morden J.P. et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat. Commun.* 2018;9(1):896. doi: 10.1038/s41467-018-03215-x.

17. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008;29 Suppl 1(Suppl 1): S49-52.
18. Riva F., Bidard F.C., Houy A. et al. Patient-Specific Circulating Tumor DNA Detection during Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Chem.* 2017;63(3): 691-699. doi: 10.1373/clinchem.2016.262337.
19. McDonald B.R., Contente-Cuomo T., Sammut S.J. et al. Personalized circulating tumor DNA analysis to detect residual disease after neoadjuvant therapy in breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 2019;11(504): pii: eaax7392. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7392.
20. Butler T.M., Boniface C.T., Johnson-Camacho K. et al. Circulating tumor DNA dynamics using patient-customized assays are associated with outcome in neoadjuvantly treated breast cancer. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 2019;5(2):pii: a003772. doi: 10.1101/mcs.a003772.
21. Rothé F., Silva M.J., Venet D. et al. Circulating Tumor DNA in HER2-Amplified Breast Cancer: A Translational Research Substudy of the NeoALTTO Phase III Trial. *Clin. Cancer Res.* 2019;25(12): 3581-3588. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2521.
22. Garcia-Murillas I., Chopra N., Comino-Méndez I. et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.1838.
23. Stover D.G., Parsons H.A., Ha G. et al. Association of Cell-Free DNA Tumor Fraction and Somatic Copy Number Alterations With Survival in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2018;36(6): 543-553. doi: 10.1200/JCO.2017.76.0033.
24. Beddowes E., Sammut S.J., Gao M., Caldas C. Predicting treatment resistance and relapse through circulating DNA. *Breast.* 2017;34 Suppl 1:S31-S35. doi: 10.1016/j.breast.2017.06.024.

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

A.G. Iyevleva^{1,2}, T.V. Gorodnova¹, S.N. Aleksakhina¹, E.I. Anisimova³, L.P. Gigolaeva¹, A.P. Sokolenko^{1,2}, K.A. Zagorodnev², V.N. Dmitriev^{4,5}, I.V. Berlev¹, P.V. Krivorotko¹, E.N. Imyanitor^{1,2,6}

Detection of TP53 mutations in plasma of ovarian cancer and breast cancer patients

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St.-Petersburg,
²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St.-Petersburg,
³Mariinskaya City Hospital, St.-Petersburg,
⁴Medical Institute of Belgorod University, Belgorod,
⁵Belgorod Oncological Dispensary, Belgorod,
⁶I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St.-Petersburg

Background. The analysis of circulating tumor DNA provides wide opportunities for monitoring the results of cancer treatment. Somatic mutations in TP53 gene are present in almost all breast carcinomas developing in hereditary BRCA1 mutation carriers, as well as in the majority of high-grade serous ovarian tumors, which makes it possible to use them for effective monitoring of these diseases.

The aim of the study was to analyze the content of tumor-specific TP53 mutations in plasma of patients with high-grade serous ovarian cancer (OC) and BRCA1-associated breast cancer (BC).

Materials and methods. At least one plasma sample was obtained from 10 patients with OC and 7 patients with BRCA1-associated BC. The primary intratumoral status of TP53 gene was determined in the archival tumor material by targeted next generation sequencing. Digital droplet PCR was applied for testing of plasma samples for the presence of tumor-specific TP53 mutations, and in one case, BRAF V600E mutation.

Results. All 8 plasma samples obtained from OC patients at the time of disease progression, before or during neoadjuvant chemotherapy, were positive for TP53 mutations. In contrast, 8 OC plasma samples obtained during remission, after surgery, or after neoadjuvant chemotherapy did not contain tumor-specific mutations. In breast cancer, circulating tumor DNA was detected in 2 of 4 samples obtained before treatment, and was not detected after the end of therapy or in remission.

Conclusion. There is a good correlation between the presence of tumor-specific TP53 mutations in circulating DNA and the disease status in OC patients, therefore TP53 is a promising marker for clinical monitoring of ovarian cancer. In breast cancer, circulating tumor DNA is less abundant, therefore TP53 mutations cannot be reliably detected by digital droplet PCR in the plasma of patients with moderate disease burden.

Key words: liquid biopsy; breast cancer; ovarian cancer; mutation